

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2007～2009

課題番号：19700373

研究課題名 (和文) ヒト型 IgG 抗体を産生する新規ヒト化 NOG マウスの開発

研究課題名 (英文) Development of novel humanized NOG mice producing human IgG antibody

研究代表者

伊藤 亮治 (ITO RYOJI)

財団法人実験動物中央研究所・免疫研究室・研究員

研究者番号：60425436

研究成果の概要 (和文)：本研究は免疫不全 NOG マウスへヒト造血幹細胞を移入する事でヒト免疫系を再構築し、このヒト化マウス内でヒト型 IgG 抗体を産生させる事を目的としている。研究期間内ではヒト免疫系に重要なヒト遺伝子を NOG マウスへ導入したトランスジェニックマウス 5 系統 (hIL-7, hLymphotoxin, hCXCL13, hIL-6, hIFN $\gamma$ ) の作出を試み、うち 3 系統 (hIL-7, hLymphotoxin, hIL-6) について導入遺伝子の発現を確認した。hLymphotoxin Tg マウスについてはヒト造血幹細胞移入実験を行っており、また hIL-6 Tg マウスについては NOG マウスとの交配により遺伝子背景を NOG マウスへ置換中である。今回我々はヒト免疫系を再構築した hIL-7 Tg マウスを用いて得られた成果について報告する。まずヒト造血幹細胞を移入した hIL-7 Tg マウスにおけるヒト細胞の生着性およびヒト T, B 細胞の分化能についてフローサイトメリーにて解析を行った。その結果、hIL-7 Tg マウスとコントロールの non-Tg マウスとの間で有意な差は認められなかった。次に分化したヒト T 細胞を分離し、in vitro で抗 CD3/CD28 抗体により刺激した後の増殖能を比較したところ、hIL-7 Tg マウス由来ヒト T 細胞の有意な増殖性亢進が認められた。本結果は IL-7 シグナルがヒト T 細胞の増殖、維持に重要であり、ヒト化マウスにおいて外来抗原認識後に起こる T 細胞のクローナルな増殖を促進させる可能性を示唆する。このことから、hIL-7 Tg マウスが従来に比べてより正常に近いヒト免疫系再構築マウスとして有用なツールになり得る。現在 hIL-7 Tg マウスへ T 依存性抗原を免疫し、抗原特異的ヒト型 IgG 抗体の作製を行っている。

研究成果の概要 (英文)：The purpose in this research is to produce human IgG antibody using humanized NOG mice that were reconstituted with the human immune system. In this study, we attempted to develop five strains of transgenic (Tg) NOG mice carrying human genes (hIL-7, hLymphotoxin, hCXCL13, hIL-6 and hIFN $\gamma$ ), which are important for the development and functional maturation of immune cells. We confirmed the expression of transgenes, hIL-7, hLymphotoxin and hIL-6 in three strains of Tg mice. Hematopoietic stem cell transplantation into hLymphotoxin Tg mice and substitution of the genetic background of hIL-6 Tg mice in NOG mice are currently underway. We report here that the results obtained by hIL-7 Tg NOG mice reconstituted with the human immune system. We analyzed engraftment and differentiation of human T and B cells in hIL-7 Tg mice by flow cytometry. As a result, the engraftment rate of human cells and differentiation into T and B cells did not differ between hIL-7 Tg NOG and control non-Tg NOG mice. To determine the potential of cell growth of human T cells developed in hIL-7 Tg NOG mice, we isolated human T cells from the spleen and stimulated them with anti-human CD3 and CD28 antibodies in vitro. As a result, human T cells from hIL-7 Tg NOG mice showed significantly higher proliferation than those from non-Tg NOG mice. This result suggests that IL-7 signaling can induce the growth phase, in differentiated human T cells, which presumably become capable of rapid elimination of foreign pathogens. Therefore, hIL-7 Tg

NOG mice have potential as a useful tool in the form of humanized mice reconstituted with the human immune system. We are attempting to produce human IgG antibodies by immunization of T cell dependent antigens using hIL-7 Tg NOG mice.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	0	1,800,000
2008年度	500,000	150,000	650,000
2009年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	2,800,000	300,000	3,100,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：実験動物学

キーワード：ヒト化マウス、ヒト型抗体

### 1. 研究開始当初の背景

マウスにヒト免疫系を再構築させ、ヒト免疫細胞の分化、免疫応答を *in vivo* で解析するモデルの作製は、従来盛んに行われ今日まで至っている。1988年、免疫不全 SCID マウスにヒト造血系組織、もしくはヒト末梢リンパ球を移植したいわゆる SCID-hu マウスの作製が行われた。さらに、造血幹細胞の分離法が確立され、ヒト造血幹細胞から各種免疫細胞系列への分化を SCID マウス内で再現できるようになった。しかし当時のヒト細胞の生着率は極めて低レベルであったため、*in vivo* 解析モデルとしては不十分な点が多く残されていた。その後 SCID マウスを改良した NOD/scid マウスの開発によって、SCID マウスを上回るヒト細胞の生着が可能となったが、ヒト T 細胞と B 細胞をマウス環境下で同時に分化させることはできず、機能的なヒト免疫系を構築させる系の確立は極めて困難であった。当研究所ではこの問題を解決すべく、NOD/scid マウスに残存する NK 細胞を除去した重度免疫不全 NOD-*scid* IL2 $\gamma$ *null* (NOG) マウスを開発した。NOG マウスは、ヒト細胞の生着率が極めて高い上にヒト T 細胞と B 細胞が末梢で共存できるという点で非常に優れた免疫不全マウスである。代表者らはヒト造血幹細胞を NOG マウスへ移植し、分化したヒトリンパ球の性状、およびその機能について解析を行ってきた。これまで得てきた知見から、NOG マウスの末梢リンパ組織中に存在する成熟 T および B 細胞は、表面マーカー上は正常のヒトリンパ球と酷似しているものの機能的に不完全で

あり、抗原免疫後に本来血中に認められる特異的 IgG 産生応答が欠失していた。免疫系の中心的役割を担う IgG 抗体の産生が欠失していることは、ヒト化 NOG マウスにおける大きな欠点であり、現状で最も重要な課題である。そのため代表者は、機能的ヒトリンパ球の分化誘導およびヒト型 IgG 抗体の産生誘導を目指し、リンパ球分化を支持するヒト遺伝子を NOG マウスへの導入したトランスジェニック NOG マウスの開発を行う。

### 2. 研究の目的

本研究ではヒト化マウスをより発展させるための新たなアプローチとして、T および B 細胞分化に必須とされるヒト遺伝子トランスジェニック NOG(Tg-NOG)マウスを作製し、抗原免疫後の特異的ヒト型 IgG 抗体を得る事を目的とする。具体的にはリンパ球分化に必要なサイトカインである IL-7, IL-6, IFN $\gamma$ 、リンパ組織の構築に必要なサイトカインおよびケモカインである Lymphotoxin, CXCL13 といった 5 種の遺伝子を NOG マウスへ導入し、得られた Tg-NOG マウスへヒト造血幹細胞を移入し、分化したヒトリンパ球の解析や抗原投与後の抗体産生等、再構築されたヒト免疫系の応答について解析を行う。このヒト化モデルマウスはヒト免疫細胞分化、機能解析の研究のみならず、創薬のための研究材料または新薬の前臨床試験等にも有用であり、医療への貢献が充分期待できる。本研究にてこのマウスの有用性を明らかにした上で、他の研究者に広範に使用されるような体制をとりたいと考えている。

### 3. 研究の方法

(1) トランスジェニック NOG マウスの作出  
ヒト培養細胞またはヒト末梢血単核球より IL-7, Lymphotoxin, CXCL13, IL-6, IFN $\gamma$  各 cDNA をクローニングし、それぞれサイトメガロウィルスプロモーター (CMV) を有する DNA ベクターに組み込んだ後、直鎖化して NOD マウス受精卵へマイクロインジェクションを行った。得られた Tg マウスの血漿および血球を採取し、ELISA 法または細胞内サイトカイン染色によりタンパクの発現解析を行った。発現が認められた Tg マウスは NOG マウスと自然交配を重ねて遺伝的背景を NOG に置き換えた後に実験に使用した。

#### (2) ヒト造血幹細胞の移植

8~10 週齢の Tg NOG および non-Tg NOG マウスへ 2.5 Gy の X 線を照射し、翌日にヒト臍帯血由来 CD34 陽性細胞 (Lonza 社より購入)  $5 \times 10^4$  個を尾静脈経路で移植した。

#### (3) ヒトリンパ球の解析

ヒト造血幹細胞移植後 4 週から 18 週間までの間、眼底静脈叢から経時的に採血を行い、蛍光標識された各種抗ヒト抗体を用いてヒト T 細胞または B 細胞への分化能および生着効率等についてフローサイトメーターにて解析を行った。また、hIL-7 Tg NOG マウス脾臓からヒト T 細胞を分離し、CFSE で標識した後に抗 CD3/CD28 抗体存在下で 7 日間培養を行った。培養後、細胞増殖した T 細胞の割合について、CFSE 蛍光の減衰を指標にフローサイトメーターにて解析した。

### 4. 研究成果

(1) トランスジェニック NOG マウスの作出クローニングした各ヒト cDNA を CMV プロモーターを有する発現ベクターに組み込んだ後、NOD マウス前核期胚へのマイクロインジェクションにより個体作製を行った。結果を表 1 に記す。

表 1 Tg マウス作製の結果

導入ヒト遺伝子名	離乳数	Tg マウス数	発現個体数
IL-7	26	2	1
Lymphotoxin	54	1	1
CXCL13	14	3	0
IL-6	34	4	2
IFN $\gamma$	56	1	0

発現が認められた hIL-7 および hLymphotoxin Tg マウスについては NOG 背景に置換した後に移入実験に使用した。IL-6 については現在 NOG 背景への置換を行っている。

(2) ヒト造血幹細胞移入 Tg マウスの解析  
IL-7 および Lymphotoxin Tg マウスへヒト造

血幹細胞を移入した。hLymphotoxin Tg マウスは現在移入実験中であるため、hIL-7 Tg マウスについての結果を記す。hIL-7 Tg および non-Tg マウスへヒト造血幹細胞移入後 4 週から 18 週にかけて経時的に採血を行い、末梢血中のヒト細胞生着性および 12 週時のヒト T, B 細胞についてヒト CD45, CD3, CD19 抗体を用いてフローサイトメーターにて解析した。その結果、ヒト細胞生着性 (図 1) および T, B 細胞分化 (図 2) とともに Tg, non-Tg 間で差は認められなかった。

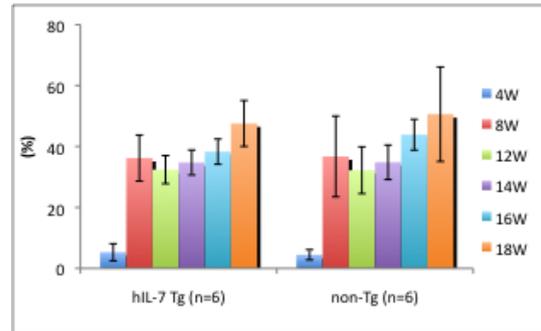


図 1 hIL-7 Tg マウスにおけるヒト細胞生着率

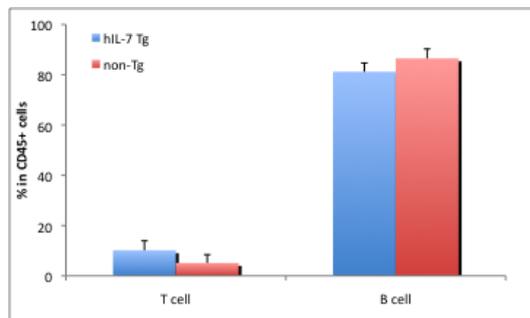


図 2 hIL-7 Tg マウスにおけるヒト T および B 細胞分化

次に hIL-7 Tg および non-Tg マウスの脾臓からマグネティックビーズを用いてヒト T 細胞を分離し、CFSE にて標識した後に抗 CD3/CD28 抗体存在下で培養した。7 日後に細胞を回収し、CFSE 蛍光強度の低下を指標としてヒト T 細胞の増殖能についてフローサイトメーターにて測定した。その結果、hIL-7 Tg マウスで分化したヒト T 細胞の増殖率は 60.1%であったのに対し、non-Tg マウス由来 T 細胞は 31.7%の増殖率に留まった (図 3)。このことから hIL-7 Tg マウスはヒト T 細胞の増殖を亢進させる可能性が示唆された。

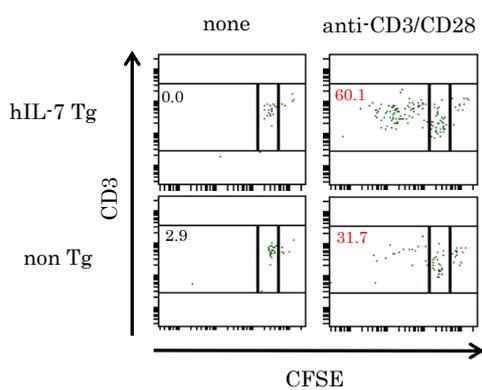


図 3 hIL-7 Tg マウスにおけるヒト T 細胞の増殖性

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

① The analysis of the functions of human B and T cells in humanized NOD/shi-scid/gammac (null) (NOG) mice (hu-HSC NOG mice).

Watanabe Y, Takahashi T, Okajima A, Shiokawa M, Ishii N, Katano I, Ito R, Ito M, Minegishi M, Minegishi N, Tsuchiya S, Sugamura K.

Int Immunol. 2009 Jul 21:843-58.

② Highly sensitive model for xenogenic GVHD using severe immunodeficient NOG mice.

Ito R, Katano I, Kawai K, Hirata H, Ogura T, Kamisako T, Eto T, Ito M.

Transplantation 2009 Jun 15:1654-8

③ Antigen-specific antibody production of human B cells in NOG mice reconstituted with the human immune system.

Ito R, Shiina M, Saito Y, Tokuda Y, Kametani Y, Habu S.

Curr Top Microbiol Immunol. 2008 324: 95-107. Review.

[学会発表] (計 5 件)

① 重度免疫不全 NOG マウスを用いた高 GVHD 感受性モデル

伊藤亮治、小倉智幸、川井健司、伊藤守  
第 55 回日本実験動物学会 2008 年 5 月

② Dendritic cells have a suppressive effect on xeno-GVHD in novel

immunodeficient NOG mice.

Ryoji ITO, Ikumi KATANO, Tomoyuki OGURA, Kenji KAWAI, Mamoru ITO  
10<sup>th</sup> International Symposium on Dendritic Cells 2008 October

③ ヒト Delta-like 1 トランスジェニック NOG マウスに発症する骨硬化はヒト造血系の再構築を抑制する

伊藤亮治、小倉智幸、入江奈緒子、松尾光一、垣生園子、伊藤守

第 26 回日本骨代謝学会 2008 年 10 月

④ High sensitivity to xeno-GVHD in severely immunodeficient NOG mice is attributable to dysfunction of dendritic cells.

Ryoji Ito, Ikumi Katano, Tomoyuki Ogura, Kenji Kawai, Mamoru Ito

2<sup>nd</sup> International Workshop on Humanized Mice 2009 April

⑤ IFN $\gamma$  producing killer dendritic cells have a suppressive effect on xeno-GVHD in NOG mice.

Ryoji Ito, Ikumi Katano, Kenji Kawai, Mamoru Ito

第 39 回日本免疫学会 2009 年 12 月

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年月日 :

国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

取得年月日 :

国内外の別 :

[その他]

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

伊藤 亮治 (ITO RYOJI)  
財団法人実験動物中央研究所 免疫研究室 研究員

研究者番号：60425436

(2)研究分担者

なし ( )

研究者番号：

(3)連携研究者

なし ( )

研究者番号：